

RECEIVED

MAR 09 2001

P.NET Inc.

2 612 937

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

①1 N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

88 03884

⑤1 Int Cl⁴ : C 12 N 1/20; C 12 P 13/14 / C 12 N 1/20, C 12 R
1:15.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 24 mars 1988.

③0 Priorité : JP, 27 mars 1987, n° 075727/1987.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 39 du 30 septembre 1988.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société dite : AJINOMOTO CO. INC. —
JP.

⑦2 Inventeur(s) : Kazuhiko Yamada ; Akira Seto.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 Nouveaux micro-organismes et procédé pour la production d'acide glutamique utilisant ces micro-organismes.

⑤7 L'invention a pour objet de nouvelles bactéries utiles pour
la production d'acide glutamique par fermentation à tempéra-
ture élevée.

Le micro-organisme selon l'invention dénommé *Corynebacte-
rium thermoaminogenes* a une température maximale de crois-
sance de pas moins de 43 °C et la thermorésistance à 55 °C
pendant 10 min ou plus et il est capable d'accumuler une
quantité importante d'acide glutamique.

FR 2 612 937 - A1

D

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

La présente invention concerne un nouveau micro-organisme capable d'accumuler une quantité importante d'acide glutamique par fermentation et un procédé pour la production d'acide glutamique par culture du micro-organisme.

- 5 Dans un procédé qui consiste à accumuler une grande quantité d'acide glutamique et à le recueillir, à savoir la production d'acide glutamique par fermentation à l'échelle industrielle, on cultive des micro-organismes capables d'accumuler une grande quantité d'acide glutamique dans un milieu, dits
- 10 bactéries productrices d'acide glutamique, dans une cuve de fermentation en utilisant un milieu approprié dans des conditions de culture convenablement contrôlées telles que pH, température, quantité d'oxygène dissous. De nombreuses publications ont été faites sur la classification des bactéries productrices d'acide
- 15 glutamique connues jusqu'à présent ; on citera par exemple les publications suivantes :
1. Kinoshita et autres, Amino Acids, 2, p. 42 (1960), ci-après Publication (1).
 2. Okumura et autres, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 36, p. 141 (1962),
 - 20 ci-après Publication (2).
 3. Takayama et autres, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 39, p. 328 (1965), ci-après Publication (3).
 4. Takayama et autres, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 39, p. 335 (1965), ci-après Publication (4).
 - 25 5. Takayama et autres, J. Agr. Chem. Soc. Japan, 39, p. 342 (1965), ci-après Publication (5).
 6. Komagata et autres, J. Gen. Appl. Microbiol., 15, p. 243 (1969), ci-après Publication (6).
 7. Yamada et autres, J. Gen. Appl. Microbiol., 16, p. 103 (1970),
 - 30 ci-après Publication (7).
 8. Yamada et autres, J. Gen. Appl. Microbiol., 16, p. 215 (1970), ci-après Publication (8).
 9. Yamada et autres, J. Gen. Appl. Microbiol., 18, p. 399 (1972), ci-après Publication (9).
 - 35 10. Yamada et autres, J. Gen. Appl. Microbiol., 18, p. 417 (1972), ci-après Publication (10).

Dans ces publications, les bactéries productrices d'acide glutamique ne sont pas nécessairement définies strictement comme des bactéries capables d'accumuler une grande quantité d'acide glutamique dans un milieu. Cependant, comme mesure de la quantité de production, les bactéries productrices d'acide glutamique sont raisonnablement interprétées comme désignant des micro-organismes utilisables industriellement capables d'accumuler au moins 30 g/l d'acide glutamique dans un milieu avec un rendement d'au moins 30 % par rapport au glucose, comme décrit dans la publication (1).

Ces bactéries productrices d'acide glutamique connues sont toutes des bâtonnets aérobies, Gram positif et ne formant pas de spores et classées dans un groupe bactérien dénommé corynébactéries. En outre, on connaît entre autres l'effet suivant concernant les propriétés morphologiques et les propriétés physiologiques et biologiques : elles sont capables d'accumuler une grande quantité d'acide glutamique dans un milieu, sont auxotrophes vis-à-vis de la biotine, contiennent de l'acide mésodiaminopimélique dans leurs parois cellulaires et ont une teneur en GC d'environ 55 % dans l'ADN, sont semblables les unes aux autres, etc. A partir de ces faits, on admet largement que des micro-organismes connus dénommés bactéries productrices d'acide glutamique sont voisins les uns des autres du point de vue taxonomique. En dépit du fait qu'elles soient considérées comme des micro-organismes voisins les uns des autres, les bactéries connues productrices d'acide glutamique sont identifiées comme appartenant à des genres différents tels que le genre *Brevibacterium*, le genre *Corynebacterium*, le genre *Microbacterium*, etc. Une cause principale de ces diverses classifications provient, pense-t-on, de pratiques antérieures dans l'identification qui se faisait entre autres selon un système différent de classification et une norme de classification de la version la plus récente actuellement du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, qui est l'ouvrage faisant le plus autorité dans le monde pour l'identification des bactéries, une différence d'un agent d'identification de la classification standard, etc. En outre, Kinoshita et autres, Publication (1), ont fait des recherches taxonomiques sur

environ 20 bactéries productrices d'acide glutamique et en utilisant comme norme de classification des propriétés communes de ces bactéries, ils ont proposé de créer le genre des bactéries productrices d'acide glutamique. Cependant, cette proposition
5 n'a pas été largement adoptée jusqu'à présent.

Dans la production d'acide glutamique par fermentation à l'échelle industrielle, on cultive les bactéries productrices d'acide glutamique ci-dessus dans un milieu contenant des composants tels que glucose, saccharose, acide acétique, etc., en
10 conditions aérobies en utilisant l'ammoniac, l'urée, le sulfate d'ammonium, etc., comme sources d'azote pour accumuler dans le milieu une quantité importante d'acide glutamique. La quantité d'acide glutamique à accumuler varie selon la composition du milieu, le pH d'incubation, la température de culture, la quantité
15 d'oxygène dissous, les moyens de sécrétion dans le milieu de l'acide glutamique produit dans les cellules, etc. Cependant, en réglant ces facteurs dans des gammes optimales, on peut accumuler l'acide glutamique avec un rendement de 30 % ou plus par rapport au glucose, à une concentration d'acide glutamique
20 accumulé de 30 g/l ou plus.

L'acide glutamique a été produit industriellement par la méthode de fermentation décrite ci-dessus non seulement au Japon, mais également dans d'autres pays. Dans la production industrielle, l'un des facteurs les plus importants est une
25 capacité de production élevée. La présente invention propose une technique très économique pour produire l'acide glutamique par fermentation à l'échelle industrielle.

Dans la production industrielle d'acide glutamique par fermentation, il existe certains paramètres techniques pour mesurer
30 le perfectionnement du point de vue économique. Par exemple, ces facteurs sont une augmentation du rendement par rapport au glucose, une augmentation de la concentration d'acide glutamique accumulé, une diminution de la durée d'incubation, etc. Un autre facteur important est l'élévation de la température d'incubation. L'incu-
35 bation est mise en oeuvre à une température optimale pour la fermentation d'acide glutamique ; dans le cas où l'on utilise

des bactéries classiques productrices d'acide glutamique, cette température est en général de 31 à 32°C. Lorsque l'incubation est amorcée, la fermentation produit de la chaleur de sorte que, si on laisse le système tel quel, la température de la solution de culture augmente de sorte que la production d'acide glutamique diminue fortement. Afin de maintenir la température de la solution de culture dans une gamme optimale, il est nécessaire de placer un échangeur de chaleur dans le fermenteur et de recycler à l'échangeur de l'eau refroidie brusquement. Afin d'obtenir de l'eau refroidie, on doit utiliser un réfrigérateur, mais à cause de la grande quantité de chaleur de fermentation produite, l'énergie électrique consommée par le réfrigérateur est également importante. En conséquence, s'il est possible d'élever la température d'incubation dans la fermentation d'acide glutamique au-dessus de la température classique, les frais de réfrigération peuvent être réduits, améliorant ainsi la production industrielle du point de vue économique.

A la suite de diverses recherches pour résoudre le problème décrit ci-dessus, la demanderesse a trouvé un nouveau micro-organisme capable de produire de l'acide glutamique dans les mêmes quantités que les bactéries classiques productrices d'acide glutamique (rendement de 30 % ou plus par rapport au glucose, quantité d'acide glutamique accumulée 30 g/l ou plus) et capable d'accumuler une quantité importante d'acide glutamique dans une gamme de températures élevées - par exemple 43°C à laquelle les bactéries classiques productrices d'acide glutamique ne poussent pas et la fermentation d'acide glutamique est impossible. On fait pousser ces micro-organismes à une température de 45°C à laquelle les bactéries classiques productrices d'acide glutamique ne peuvent pas pousser et les inventeurs ont trouvé des conditions pour l'accumulation d'une quantité importante d'acide glutamique dans un milieu par fermentation d'acide glutamique, utilisant le micro-organisme. La présente invention repose sur cette découverte.

En ce qui concerne la température de croissance des bactéries classiques productrices d'acide glutamique, la température

de croissance est une propriété commune aux bactéries productrices d'acide glutamique dans toutes les publications, dans la mesure où elle est mentionnée dans les publications mentionnées ci-dessus. Autrement dit, on indique dans la Publication (1) que les bactéries productrices d'acide glutamique poussent bien à 28-37°C. Dans la Publication (2), les bactéries poussent bien à 30-37°C, mais beaucoup de bactéries ne poussent presque pas à 40°C. Il est également indiqué dans la Publication (4) que la température optimale de croissance est de 25 à 37°C, mais les bactéries ne poussent presque pas à 42°C. Il est indiqué dans la Publication (9) qu'aucune bactérie ne pousse à 42°C. Il est indiqué dans la Publication (9) qu'aucune bactérie ne pousse à 42°C. Même en admettant que les procédés et les normes d'évaluation de la croissance puissent être différents dans les publications respectives, on suppose que la température de croissance la plus élevée des bactéries classiques productrices d'acide glutamique serait d'environ 42°C. La demanderesse a déterminé la température de croissance la plus élevée de chacune des 20 souches indiquées dans le tableau 1 ci-après, qui sont presque toutes des souches bactériennes accessibles à partir de bactéries connues que l'on suppose productrices d'acide glutamique, par deux procédés, à savoir une méthode à thermostat liquide secoué utilisant un bouillon nutritif comme milieu, et par culture sur plateau avec un thermostat gazeux de grande précision utilisant une gélose nutritive comme milieu. En conséquence, on n'observe pas du tout de croissance des souches essayées à 42°C par l'une ou l'autre des méthodes de culture en liquide et sur plaque. On a donc estimé que la température de croissance la plus élevée des bactéries classiques productrices d'acide glutamique est inférieure à 42°C.

TABLEAU 1

Température de croissance la plus élevée et résistance à la température mesurée sur les bactéries productrices d'acide glutamique connues.

Brevibacterium ammoniagenes	ATCC 13745
Brevibacterium divaricatum	NRRL B2312
Brevibacterium flavum	ATCC 13826
Brevibacterium flavum	ATCC 14067
Brevibacterium glutamigenes	ATCC 13747
Brevibacterium immariophilum	ATCC 14068
Brevibacterium lactofermentum	ATCC 13869
Brevibacterium roseum	ATCC 13825
Brevibacterium saccharolyticum	ATCC 14066
Brevibacterium taipei	ATCC 13744
Brevibacterium thiogenitalis	ATCC 19240
Corynebacterium acetoacidophilum	ATCC 13870
Corynebacterium callunae	NRRL B2244
Corynebacterium glutamicum	ATCC 13032
Corynebacterium glutamicum	ATCC 13761
Corynebacterium herculis	ATCC 13868
Corynebacterium lilium	NRRL B2243
Corynebacterium melassecola	ATCC 17965
Corynebacterium sp.	ATCC 14747
Microbacterium ammoniaphilum	ATCC 15354

Dans l'hypothèse où, afin d'effectuer la production d'acide glutamique par fermentation dans une gamme de températures plus élevées que les températures d'incubation classiques, les micro-organismes nécessaires seraient des micro-organismes ayant une température de croissance maximale supérieure à celle des bactéries classiques productrices d'acide glutamique, la demande-
5 resse a isolé des micro-organismes qui poussent à 43°C à partir de divers échantillons dans le monde naturel comme sources d'isolement et on fait un relevé de souches capables d'accumuler une
10 quantité importante d'acide glutamique dans un milieu et elle a acquis 14 souches de sources différentes pour l'isolement des micro-organismes. D'après les résultats d'essais et l'identification des propriétés bactériologiques de ces souches, on a estimé que les souches isolées sont voisines les unes des autres et
15 classées dans la même espèce. On décrit ci-dessous les propriétés bactériologiques de quatre souches représentatives (souches n° AJ 12308, AJ 12309, AJ 12310 et AJ 12340).

Caractéristiques morphologiques

(1) Formes et dimensions
des cellules

Bâtonnets de 0,7-1,0 μm
x 1,0-4,0 μm ronds aux
2 extrémités des cellules ;
on observe une disposition
en V de division par rupture ;

(2) Pléomorphisme

On n'observe pas de pléo-
morphisme mais selon la
durée de culture, on
observe rarement des cel-
lules en bâtonnets longs,
des cellules kystiques
et des cellules à rami-
fications rudimentaires.

(3) Motilité

non non non

(4) Formation de spores

non non non

(5) Gram

positif positif positif

(6) Coloration résistant
à l'acide

négative négative négative

AJ 12308

AJ 12309

AJ 12310

AJ 12340

Caractéristiques de culture :

	<u>AJ 12308</u>	<u>AJ 12302</u>	<u>AJ 12310</u>	<u>AJ 12340</u>
(1) Culture sur plaque de gélose nutritive	Croissance abondante ou modérée : les colonies sont rondes, lisses, entières, convexes, brillantes, opaques ou translucides, jaune pâle et butyreuses.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	Croissance abondante ou modérée ; les colonies sont rondes, lisses, satinées, opaques ou translucides, jaune pâle et en pailettes.
(2) Culture sur gélose nutritive inclinée	Croissance abondante ou modérée ; les colonies sont filiformes, brillantes et jaune pâle.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche
(3) Bouillon nutritif	Croissance modérée : presque uniformément trouble mais quelques cellules précipitent.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	Croissance modérée ; les cellules tendent à se rassembler et précipitent également.
(4) Culture par piqûre sur gélatine nutritive	Croissance modérée : pas de liquéfaction	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche
(5) Lait de tournesol	Rendu très faiblement alcalin ; on n'observe ni liquéfaction, ni coagulation.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche

	<u>AJ 12308</u>	<u>AJ 12309</u>	<u>AJ 12310</u>	<u>AJ 12340</u>
Caractéristiques physiologiques et biologiques :				
(1) Réduction des nitrates	réduits	réduits	réduits	réduits
(2) Dénitrification	négative	négative	négative	négative
(3) Test MR	négatif ou faiblement positif	négatif	négatif ou faiblement positif	positif
(4) Test VP	positif	négatif	positif	négatif
(5) Formation d'indole	négative	négative	négative	négative
(6) Formation de sulfure d'hydrogène	positive	positive	positive	positive
(7) Hydrolyse de l'amidon	négative	négative	négative	négative
(8) Utilisation des citrates	ne pousse pas dans le milieu de Koser, mais pousse dans le milieu de Christensen en le rendant alcalin	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche
(9) Utilisation de l'azote inorganique	n'utilise pas les nitrates, mais utilise les sels d'ammonium	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche

	<u>AJ 12308</u>	<u>AJ 12309</u>	<u>AJ 12310</u>	<u>AJ 12340</u>
(10) Formation de pigment	pas de formation extra-cellulaire de pigment.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche
(11) Test de l'uréase	négatif ou faiblement positif.	négatif	négatif ou faiblement positif	positif
(12) Oxydase	négative	négative	négative	négative
(13) Catalase	positive	positive	positive	positive
(14) Gamme de croissance	pousse bien à pH 7-9,5 ; pousse bien à 25-45°C ; légère croissance observée à 46°C.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	pousse bien à pH 7-9,5 ; pousse bien à 25-44°C ; légère croissance observée à 45°C.
(15) Comportement à l'oxygène	aérobie ou facultativement anaérobie.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche
(16) Test O-F (glucose)	pousse en produisant de l'acide par fermentation.	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche

(17) Formation d'acides à partir des sucres :

AJ 12340

négative
 négative
 positive
 positive
 positive
 négative
 négative
 positive
 négative
 négative
 négative
 positive
 positive
 négative
 négative

AJ 12310

négative
 négative
 positive
 positive
 positive
 négative
 positive
 négative
 négative
 positive
 négative
 négative
 négative
 négative
 négative

AJ 12309

négative
 négative
 positive
 positive
 positive
 négative
 positive
 positive
 négative
 négative
 négative
 négative
 négative
 négative

AJ 12308

négative
 négative
 positive
 positive
 positive
 négative
 positive
 positive
 négative
 négative
 négative
 négative
 négative
 négative

Autres caractéristiques

(1) Résistance à la température

survit dans le lait écrémé 10 min à 60°C, par la méthode au capillaire; meurt après 10 min à 65°C.

survit dans le lait écrémé à 55°C pendant 10 min, par la méthode au capillaire; meurt après 10 min à 60°C.

survit dans le lait écrémé à 60°C pendant 10 min, par la méthode au capillaire; meurt après 10 min à 65°C.

(2) Résistance au chlorure de sodium

comme colonne de gauche

comme colonne de gauche

pousse dans un milieu contenant 5 % de sel. de gauche

(3) Auxotrophie	AJ 12308		AJ 12309		AJ 12310		AJ 12340	
	a besoin de biotine pour pousser	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche
(4) Composition de base de l'ADN (méthode Tm)	60,2 % de GC	59,5 % de GC	59,0 % de GC	56,8 % de GC				
(5) Monoacide dibasique contenu dans les parois cellulaires	acide mésodiamino- pimélique	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche	comme colonne de gauche				
(6) Source d'isolement	fruits	légumes	sol	fruits				

Comme indiqué ci-dessus, ces souches bactériennes (ci-après dénommées bactéries de la présente invention) sont toutes des bâtonnets Gram positif, ne formant pas de spores, qui poussent par voie aérobie et appartiennent donc au groupe des coryné-
5 bactéries. En outre, les bactéries de la présente invention ont les caractéristiques suivantes : le mode de division cellulaire est du type par rupture ; l'acide aminé dibasique contenu dans les parois cellulaires est l'acide mésodiaminopimélique ; ce sont des bactéries résistantes à l'osmose capables de pousser dans
10 un milieu contenant 5 % de sel ; elles ont besoin de biotine pour leur croissance ; elles produisent une quantité importante d'acide glutamique à partir des sucres avec un rendement élevé et l'accumulent dans le milieu comme indiqué dans les exemples décrits ci-après, etc. ; et ces propriétés sont identiques à celles des
15 bactéries connues classiques productrices d'acide glutamique. En outre, dans les autres propriétés morphologiques, physiologiques et biologiques, les bactéries ont de nombreuses propriétés communes aux bactéries connues productrices d'acide glutamique.

D'après ce qui précède, on considère en ce qui concerne le
20 genre que les bactéries de la présente invention appartiendraient raisonnablement au même genre que les bactéries connues productrices d'acide glutamique. Comme décrit précédemment, les opinions peuvent être divisées sur le genre dans lequel doivent être classées les bactéries connues productrices d'acide glutamique, mais selon
25 le tout récent Bergey's Manual, 8e édition, en rapport avec le groupe des corynébactéries défini en référence aux publications (1) à (10), etc., les bactéries connues productrices d'acide glutamique sont divisées entre le genre *Corynebacterium* et le genre *Brevibacterium*. En tenant compte de ce que le genre *Brevibacterium* est
30 lui-même traité comme un "Genus incertae sedis" du point de vue taxonomique et le genre *Corynebacterium* comme un genre ordinaire, cependant, on considère tout à fait probable à l'heure actuelle que les bactéries de la présente invention appartiennent au genre *Corynebacterium*.

35 On donne à la suite un examen taxonomique des bactéries de l'invention au niveau de l'espèce. Les trois points suivants

dans les propriétés bactériologiques sont différents entre les bactéries de la présente invention et les bactéries connues productrices d'acide glutamique en commun. Un premier point caractéristique est que la température la plus élevée révélant une croissance nettement observable est de 43°C ou plus. Comme décrit ci-dessus, la température de croissance la plus élevée des bactéries connues productrices d'acide glutamique est d'environ 42°C ou moins, mais il n'existe pas de bactéries capables de pousser à 43°C ou plus.

Un second point caractéristique est la résistance à la température. Dans la résistance à la température, on ne peut obtenir que difficilement des résultats précis dans le cas où l'on effectue le test à grande échelle en utilisant un tube à essais, etc., parce que la durée de conduction thermique, etc., varient fortement. Donc, un test effectué en mettant en suspension les bactéries dans le lait écrémé et en enfermant la suspension de manière étanche dans un tube capillaire est considéré comme meilleur (Publication (3)). Les bactéries de la présente invention peuvent toutes survivre dans le lait écrémé après traitement à 55°C pendant 10 min par la méthode du tube à essais capillaire. Au contraire, la plupart des bactéries connues productrices d'acide glutamique sont mortes après un traitement à 55°C pendant 10 min selon cette technique ; mais une publication indique que quelques bactéries présentent une légère survie (Publication (3)).

En rapport avec cette publication, la demanderesse a reproduit l'expérience. Le test de thermostabilité a été effectué avec toutes les bactéries connues productrices d'acide glutamique indiquées dans le tableau 1 dans les mêmes conditions que pour les bactéries de la présente invention ; en conséquence, les bactéries connues productrices d'acide glutamique sont toutes mortes par traitement à 55°C pendant 10 min. Par contre, dans les bactéries de la présente invention, les 14 souches isolées survivent toutes dans le traitement à 55°C pendant 10 min. En outre, 11 de ces souches survivent également même après traitement à 60°C pendant 10 min.

Un troisième point caractéristique est que les bactéries de la présente invention peuvent accumuler une quantité importante d'acide glutamique même à 43°C. Les conditions de l'expérience et les quantités d'acide glutamique accumulées sont indiquées dans les exemples. On a déterminé l'accumulation d'acide glutamique dans les mêmes conditions par les bactéries connues productrices d'acide glutamique indiquées dans le tableau 1, mais toutes les souches bactériennes ne poussent pas et la quantité d'acide glutamique accumulée est pratiquement nulle.

Les propriétés des bactéries de la présente invention décrites ci-dessus ne sont pas observées avec les bactéries connues productrices d'acide glutamique ; en particulier, il est impossible d'augmenter ou d'améliorer les propriétés de température maximale de croissance et de thermostabilité par une opération en vue de la mutation des micro-organismes et ces propriétés sont considérées comme stables. En conséquence, on peut interpréter les résultats comme donnant une base suffisante pour considérer que les bactéries de la présente invention sont différentes de n'importe laquelle des bactéries connues productrices d'acide glutamique. En outre, on observe de légères différences dans les propriétés morphologiques telles que conditions de croissance, nuance de couleur des colonies, etc., et des différences dans les propriétés physiologiques et biochimiques telles que formation d'acide à partir de saccharose, de maltose, de tréhalose, de D-mannitol, D-inositol, etc., test MR, test VP, réduction des nitrates et test de l'uréase, etc., entre les 14 souches isolées de la présente invention. Ces différences sont au niveau de la souche mais on considère qu'elles ne conviennent pas pour les classer dans des espèces différentes. Donc, les bactéries de la présente invention ont toutes été identifiées comme appartenant à la même espèce.

On a effectué une comparaison des bactéries de la présente invention avec des bactéries appartenant au groupe des corynébactéries autres que les bactéries productrices d'acide glutamique ; cependant, on n'a pas trouvé de bactéries dans l'espèce correspondante. D'après ce qui précède, les bactéries de la présente invention ont toutes été identifiées comme une nouvelle

espèce du genre *Corynebacterium* et dénommées *Corynebacterium thermoaminogenes* nov. sp.

Dés souches représentatives appartenant à cette espèce sont les souches AJ 12308, AJ 12309, AJ 12310 et AJ 12340, qui ont été déposées sous les n° FERM P-9244 (FERM BP-1540), FERM P-9245 (FERM BP-1541), FERM P-9246 (FERM BP-1542) et FERM P-9277 (FERM BP-1439) respectivement.

Ces souches identifiées ci-dessus par les n° FERM P-9244, 9245, 9246 et 9277 ont été initialement déposées le 10 mars 1987 (FERM P-9244 à 9246) et le 13 mars 1987 (FERM P-9277) à l'Institut de Recherche sur la Fermentation, Agence de l'Industrie et de la Technologie, Ministère du Commerce International et de l'Industrie (FHI), 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaragi-Ken 305, Japon, et on leur a attribué les n° FERM P-9244, 9245, 9246 et 9277 indiqués ci-dessus.

Ces dépôts de souches ont ensuite été convertis en dépôts selon le traité de Budapest le 27 octobre 1987. Et les souches FERM P-9244, P-9245, P-9246 et P-9277 ont reçu les numéros correspondants FERM BP-1540, 1541, 1542 et 1539, respectivement.

Exemple 1

Dans un petit fermenteur ayant un volume de 1 l, on charge 300 ml d'un milieu liquide de culture ayant la composition indiquée dans le tableau 2 ci-après et on cultive *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12308 à une température de 43°C, tout en effectuant des additions appropriées de gaz ammoniac pour maintenir le pH du milieu de culture à 7,5-8,0. Cinq heures après le début de la culture, on ajoute de la pénicilline à une concentration de 3 U/ml lorsque la densité optique atteint 0,6 et on poursuit encore la culture. La solution de culture obtenue après incubation pendant 16 h est analysée par chromatographie liquide haute performance. En conséquence, l'acide glutamique s'est accumulé à une concentration de 39,1 g/l. La quantité d'acide glutamique accumulée est de 0,1 g/l ou moins dans un essai effectué simultanément avec *Brevibacterium flavum* ATCC 13826 dans les mêmes conditions.

TABLEAU 2

Composition du milieu utilisé dans le test de
production par fermentation d'acide glutamique

	Glucose	100	g
5	Hydrolysate de soja (en azote total)	0,36	g
	KH ₂ PO ₄	1	g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O.	1	g
	Fe ⁺⁺ , Mn ⁺⁺	2	mg chacun
	Vitamine B ₁ .HCl	100	γ
10	Biotine	100	γ
	Sulfate d'ammonium	5	g
	Eau	1 000	ml

pH 7,8

Exemple 2

- 15 On met en oeuvre la production par fermentation d'acide glutamique en utilisant *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12309 de manière semblable à l'exemple 1. En conséquence, il s'est accumulé 40,0 g/l d'acide glutamique dans la solution de culture obtenue après incubation pendant 19 h.

20 Exemple 3

- On met en oeuvre la production par fermentation d'acide glutamique en utilisant *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12310 de manière semblable à l'exemple 1. En conséquence, il s'est accumulé 35,2 g/l d'acide glutamique dans la solution de culture obtenue après incubation pendant 17 h.

25 Exemple 4

- On met en oeuvre la production par fermentation d'acide glutamique en utilisant *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12340 de manière semblable à l'exemple 1. En conséquence, il s'est accumulé 38,1 g/l d'acide glutamique dans la solution de culture obtenue après incubation pendant 18 h.

Exemple 5

Dans un petit fermenteur d'un volume de 1 l, on charge 300 ml de milieu liquide de culture ayant la composition indiquée dans le tableau 2 dont on a retiré le glucose et le sulfate d'ammonium et auxquels on a ajouté 20 g d'acétate d'ammonium et on cultive *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12308 à une température de 40°C tout en ajoutant des suppléments convenables d'acide acétique ou de gaz d'ammoniac pour maintenir le pH du liquide de culture à 7,5-8,0. Huit heures après le début de la culture, on ajoute de la pénicilline à une concentration de 3 U/ml lorsque la densité optique atteint 0,6 et on poursuit encore la culture. La solution de culture obtenue après incubation pendant 24 h est analysée par chromatographie liquide haute performance. En conséquence, l'acide glutamique s'est accumulé à une concentration de 32 g/l, ce qui correspond à un rendement de 31,5 % par rapport à l'acide acétique.

Il est entendu que l'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation préférés décrits ci-dessus à titre d'illustration et que l'homme de l'art peut y apporter diverses modifications et divers changements sans toutefois s'écarter du cadre et de l'esprit de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Nouveau micro-organisme dénommé *Corynebacterium thermoaminogenes*, caractérisé en ce qu'il a une température maximale de croissance de pas moins de 43°C et une thermorésistance
5 à 55°C pendant 10 min ou plus et il est capable d'accumuler une quantité importante d'acide glutamique.
2. Micro-organisme selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en une souche choisie parmi FERM BP-1539, FERM BP-1540, FERM BP-1541 et FERM BP-1542.
- 10 3. Procédé pour la production d'acide glutamique par fermentation, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer la fermentation d'acide glutamique en utilisant *Corynebacterium thermoaminogenes* et à recueillir l'acide glutamique à partir de la solution de culture.
- 15 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit *Corynebacterium* consiste en une souche choisie parmi FERM BP-1539, FERM BP-1540, FERM BP-1541 et FERM BP-1542.